

## KRISTALNA I MOLEKULSKA STRUKTURA FOTODEGRADACIONOG PROIZVODA NIZOLDIPINA

Agneš Kapor, Bela Ribar, Zoran Tomić, Valentina Marinković, Sote Vladimirov

*Potencijalna i u opštem slučaju selektivna antihipertenzivna i antianginozna aktivnost nizoldipina kao i njegova izuzetna fotosenzitivnost na dnevnom svetlu, inicirala je istraživanje njegove molekulske strukture kao i molekulske strukture njegovih produkata. Iz metanolnog rastvora nizoldipina izloženog dejstvu dnevne svetlosti dobijeni su kristalizacijom potencijalni produkti fotodegradacije. Pretpostavljeno je da se radi o nitrozo derivatu nizoldipina, tačke topljenja 151-152°C. Kristalna i molekulska struktura određena je metodom difrakcije rendgenskih zraka (MoK $\alpha$ ,  $\lambda=0.71073\text{Å}$ ). Na osnovu 3858 izmerenih intenziteta refleksa rešena je molekulska struktura, direktnom metodom primenom programa SHELXS83 i utačnjena metodom najmanjih kvadrata (SHELXL93) do konačnog R-faktora  $R=0.0578$  za 1953 refleksa ( $F_o > 4\sigma(F_o)$ ) i 334 parametra. Dobijena molekulska struktura: izobutil metil-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-1,4-dihidropiridin-3,5-dikarboksilat, potvrdila je da se radi o nizoldipinu i da nema osnova govoriti da kristali pripadaju nekom od pretpostavljenih produkata fotodegradacije.*

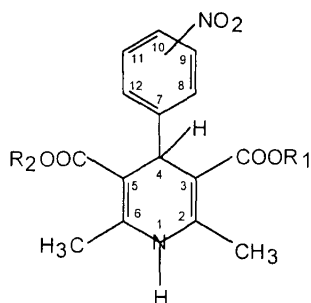
**KLJUČNE REČI:** *nizoldipin, rendgenostrukturna analiza, antagonist kanala Ca<sup>2+</sup>, veza između strukture i biološke aktivnosti*

### UVOD

Derivati 1,4-dihidropiridina kao i **verapamil**, **diltiazem** i **nifedipin** su predstavnici lekova koji imaju široku primenu u lečenju kardiovaskularnih oboljenja. Ovi derivati spadaju u kategoriju lekova koji se primenjuju u terapiji kao blokatori kalcijumovih kanala, odnosno predstavljaju selektivne antihipertenzivne i antianginozne lekove.

---

Prof. Dr. Agneš Kapor, redovni profesor, Prof. dr. Bela Ribar, akademik, Univerzitet u Novom Sadu, Institut za fiziku, Prirodno-matematički fakultet, 21000 Novi Sad, Trg D. Obradovića 4, Jugoslavija; Mr Zoran Tomić, istraživač u naučnom radu, Institut za nuklearne nauke "Vinča", 11001 Beograd, Jugoslavija; Mr Valentina Marinković, specijalista kontrole lekova, Sektor kontrole kvaliteta, "Zdravlje", Farmaceutsko-hemijska industrija, 16000 Leskovac, Jugoslavija; Prof. dr Sote Vladimirov, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Odsek za farmaceutsku hemiju i kontrolu lekova, 11000 Beograd, Vojvode Stepe 450, Jugoslavija.



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	X-NO <sub>2</sub>	
I	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	8	nizoldipin
II	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	8	nifedipin
III	CH <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> )	CH <sub>3</sub>	9	nitrendipin

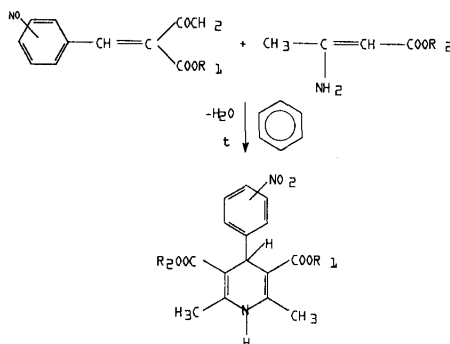
Slika 1. Strukturne formule derivata 1,4 – dihidropiridina

Zbog njihovog aktivnog i selektivnog strukturno specifičnog dejstva, poznavanje molekulske strukture ovih lekova je važno za izučavanja strukture i funkcije Ca<sup>2+</sup> kanala. Derivati 1,4-dihidropiridina, analozi nifedipina i nizoldipina (Slika 1), su posebno važni za analizu zbog mogućnosti sinteze širokog spektra različitih derivata kao i zbog postojanja među njima i aktivnih i antagonističnih liganada. Antagonisti Ca<sup>2+</sup> kanala su heterogene grupe agenata sa zajedničkom karakteristikom, sposobnošću da blokiraju kretanje kroz potencijalno zavisani Ca<sup>2+</sup> kanal.

Do sada su izvršena opsežna istraživanja na seriji izobutil metil 2,6-dimetil-4-(X-supstituisani fenil)-1,4-dihidropiridin-3,5-dikarboksilati (X=H, 2-NO<sub>2</sub>, 3-NO<sub>2</sub>, 3-CN, 3-MeO, 4-F, 2-CF<sub>2</sub>, 3-CF<sub>3</sub> i 4-Cl) (1), koja su ukazala na određenu vezu između molekulske strukture derivata i farmakološke aktivnosti ovih racematskih jedinjenja, blokatora kalcijumovih jona. Rešavanje kristalne i molekulske strukture i konformacije, analiza energije konformacije molekula, pomoću molekularno-mehaničkih proračuna, kao i biološki testovi, ukazali su na značaj vrste i položaja supstituenta R<sub>1</sub> i R<sub>2</sub> u piridinskom prstenu kao i položaja supstituenta X u fenilnom prstenu.

Ispitivano jedinjenje nizoldipin spada u grupu derivata 1,4-dihidropiridina čija se kristalna struktura ispituje u cilju povezivanja strukture i farmakološke aktivnosti (**structure-activity correlations**).

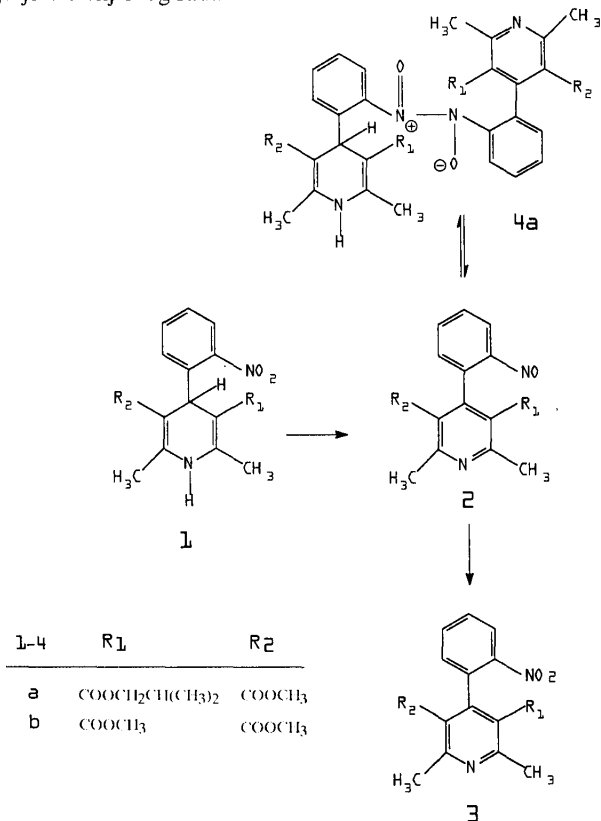
## EKSPERIMENTALNI DEO



Slika 2. Sinteza derivata 1,4 – dihidropiridina (2)

Sinteza derivata *1,4-dihidropiridina*, koji su našli primenu kao Ca antagonisti, se odvija Micheal-ovom adicijom (2) *iliden-β-ketokarbonske kiseline* sa estrima *3-amino-2-butenske kiseline* (Slika 2). Jedinjenje nizoldipin (*3-metil-5-izobutil-2,6-dimetil-4(2-nitrofenil)-1,4-dihidropiridin-3,5-dikarboksilat*) je dobijeno delovanjem amonijaka na estre 3-keto-2-butenske kiseline (Slika 2, R<sub>1</sub>=izobutil, R<sub>2</sub>=metil). Uslovi reakcije su poboljšani u tom smislu da je uporedna reakcija minimizirana, tako da je formiranje simetričnog diestra i supstituisanog 1,2,3,4-tetrahidropirimidina kao nečistoće u značajnoj meri izbegnuto.

Hemijski, nizoldipin je veoma sličan nifedipinu (Slika 1), prvom sintetičkom kalcijumovom antagonistu, uvedenom u terapiju. Poznata je fotosenzitivnost nizoldipina (3) i pretpostavljeni produkti fotohemijske degradacije su dati na Slici 3. Istraživanje ovih produkata kao nečistoća u kristalnom stanju je bio cilj ovog rada.



**Slika 3.** Predpostavljeni produkti fotohemijske degradacije nizoldipina

Od nizoldipina a.s.99,88% (PROMED-Prag, Češka) napravljen je metanolni rastvor koncentracije 5 mg/ml. Rastvor je ostavljen na dnevnom svetlu dok nije došlo do degradacije, koja je praćena HPLC metodom (4). Dobijenom rastvoru je dodata dvostruko veća količina destilovane vode, iz koga su se posle dva dana iskristalisali igličasti zeleni kristali. Kristali za analizu su dobijeni rekristalizacijom iz etilacetata i imali su tačku topljenja 151-152°C.

Kristalna i molekulska struktura izdvojenog kristala određena je metodom difrakcije rendgenskih zraka na monokristalnom uzorku. Intenziteti refleksa izmereni su na

automatskom četvorokružnom difraktometru CAD-4 korišćenjem MoK $\alpha$  ( $\lambda=0,71073\text{\AA}$ ) zračenja. Određeni su parametri elementarne ćelije kristala kao i kristalni sistem i prostorna grupa (Tabela 1.) Na osnovu 3858 izmerenih intenziteta refleksa, rešena je kristalna struktura direktnom metodom primenom programa SHELXS83 (5). Položaji atoma i temperaturski faktori su utaćnjeni metodom najmanjih kvadrata (SHELXL93) (6) do konačnog R-faktora  $R=0,0578$  za 1953 ( $F_o > 4\sigma(F_o)$ ) refleksa i 334 parametra.

**Tabela 1.** Kristalografski parametri i utaćnjavanje strukture

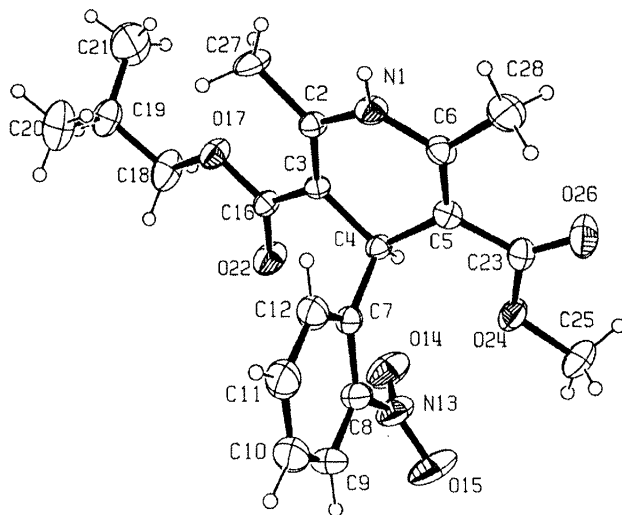
Empirijska formula	$C_{20}H_{24}N_2O_6$
Molekulska teina	$M_r = 388,41$
Temperatura	293(2) K
Talasna duina	0,71070 derivata 1,4 – dihidropiridina
Kristalni sistem	monokliniski
Prostorna grupa	$P2_1/n$
Parametri elementarne ćelije kristala	$a = 10,795(2)\text{\AA}$ $\alpha = 90$ $b = 15,612(2)\text{\AA}$ $\beta = 103,73(2)$ $c = 12,251(2)\text{\AA}$ $\gamma = 90$
Zapremine el.ćelije kristala	$2005,7(6)\text{\AA}^3$
Z (broj stehimetrijskih jedinica)	4
Gustina (izračunata)	$1,286\text{ Mg/m}^3$
Koeficijent apsorpcije	$0,096\text{ mm}^{-1}$
F(000)	824
oblast merenja refleksa	$2,15\text{ do }24,98^\circ$
Milerovi indeksi	$-12 \leq h \leq 12, 0 \leq k \leq 18, 0 \leq l \leq 14$
Broj merenih refleksa	2964
Nezavisni refleks	2846 [R(int) = 0,0233]
Metod utaćnjavanja	Full-matrix least-squares on $F^2$
Refleks/ ograničenja / parametri	2846 / 0 / 334
Goodness-of-fit od $F^2$	1,031
Konačni R faktor [ $I > 2\sigma(I)$ ]	$R_1 = 0,0549, wR_2 = 0,1182$
R faktor (svi refleks)	$R_1 = 0,0912, wR_2 = 0,1312$
Koeficijent ekstinkcije	0,0032(10)
Maksimum i minimum elektronske gustine u diferentnoj Fourier mapi	0,175 i -0,200 $e\text{\AA}^{-3}$

## RAZULTATI I DISKUSIJA

Rešena molekulska struktura ispitivanog kristala prikazana je na Slici 4. Na osnovu analize diferentne Fourier mape, i vrednosti maksimuma ( $0,175\text{ e}\text{\AA}^{-3}$ ) i minimuma ( $-0,200\text{ e}\text{\AA}^{-3}$ ) pika elektronske gustine, potvrđeno je da se radi o jedinjenju nizoldipinu (*izobutil metil-2,6-dimetil-4-(2-nitrofenil)-1,4-dihidropiridin-3,5-dikarboksilat*) i da nema promene položaja supstituenta u fenilnom prstenu.

Analiza dužine hemijskih veza i uglova u piridinskom prstenu (Tabela 2) pokazala je dobro slaganje sa teorijskim vrednostima za isti tip hemijskih veza, kao i sa rezultatima dobijenim u prethodnim istraživanjima (1). U okviru tačnosti primenjene metode rendgenostrukturalne analize, koja zavisi pre svega od kvaliteta kristalnog uzorka, a samim tim

i od broja i intenziteta izmerenih refleksa, može se tvrditi da nema migracije vodonikovih atoma sa položaja 1 i 4. Diferentna Fourier-ova sinteza nedvosmisleno potvrđuje prisustva atoma vodonika u položajima 1 i 4 i samim tim odbacuje mogućnost da se radi o nekom od jedinjenja, koja su pretpostavljena kao produkti degradacije.



Slika 4. ORTEP (7) slika molekula sa označenim nevodoničnim atomima

Tabela 2. Dužina hemijskih veza [Å] i vrednosti valentnih uglova [°]

N(1)-C(6)	1.370(4)	C(6)-N(1)-C(2)	124.0(3)
N(1)-C(2)	1.378(4)	C(3)-C(2)-N(1)	118.8(3)
C(2)-C(3)	1.354(4)	C(3)-C(2)-C(27)	128.4(3)
C(2)-C(27)	1.502(4)	N(1)-C(2)-C(27)	112.9(3)
C(3)-C(16)	1.450(4)	C(2)-C(3)-C(16)	124.2(3)
C(3)-C(4)	1.525(4)	C(2)-C(3)-C(4)	121.3(3)
C(4)-C(5)	1.521(4)	C(16)-C(3)-C(4)	114.5(2)
C(4)-C(7)	1.535(4)	C(5)-C(4)-C(3)	110.7(2)
C(5)-C(6)	1.349(4)	C(5)-C(4)-C(7)	109.6(2)
C(5)-C(23)	1.460(4)	C(3)-C(4)-C(7)	110.3(2)
C(6)-C(28)	1.496(5)	C(6)-C(5)-C(23)	120.5(3)
C(7)-C(8)	1.394(4)	C(6)-C(5)-C(4)	120.8(3)
C(7)-C(12)	1.389(5)	C(23)-C(5)-C(4)	118.6(3)
C(8)-C(9)	1.391(6)	C(5)-C(6)-N(1)	119.7(3)
C(8)-N(13)	1.463(5)	C(5)-C(6)-C(28)	126.8(3)
C(9)-C(10)	1.351(7)	N(1)-C(6)-C(28)	113.4(3)
C(10)-C(11)	1.359(7)	C(8)-C(7)-C(12)	115.2(3)
C(11)-C(12)	1.374(5)	C(8)-C(7)-C(4)	126.6(3)
N(13)-O(14)	1.197(4)	C(12)-C(7)-C(4)	118.1(3)
N(13)-O(15)	1.225(4)	C(9)-C(8)-C(7)	122.2(4)
C(16)-O(22)	1.212(3)	C(9)-C(8)-N(13)	115.3(4)
C(16)-O(17)	1.331(3)	C(7)-C(8)-N(13)	122.4(3)
O(17)-C(18)	1.456(4)	C(10)-C(9)-C(8)	119.6(4)
C(18)-C(19)	1.497(5)	C(9)-C(10)-C(11)	120.3(4)
C(19)-C(21)	1.484(8)	C(10)-C(11)-C(12)	120.0(5)
C(19)-C(20)	1.506(6)	C(11)-C(12)-C(7)	122.5(4)
C(23)-O(26)	1.205(4)	O(14)-N(13)-O(15)	121.7(4)
C(23)-O(24)	1.342(4)	O(14)-N(13)-C(8)	120.9(3)
O(24)-C(25)	1.442(4)	O(15)-N(13)-C(8)	117.4(4)
		O(22)-C(16)-O(17)	120.6(3)
O(22)-C(16)-C(3)	122.9(3)	O(17)-C(16)-C(3)	116.5(2)
C(16)-O(17)-C(18)	117.2(3)	O(17)-C(19)-C(19)	108.3(3)
C(21)-C(19)-C(18)	112.9(4)	C(21)-C(19)-C(20)	112.1(5)
C(18)-C(19)-C(20)	111.3(4)	O(26)-C(23)-O(24)	121.4(3)
O(26)-C(23)-C(5)	127.6(3)	O(24)-C(23)-C(5)	111.0(3)
C(23)-O(24)-C(25)	116.4(3)		

Molekularno-mehanički proračuni energije konformacije molekula derivata *1,4-dihidropiridina* (1) kao i odgovarajući biološki testovi ukazuju na to da kod antagonistički aktivnih derivata *1,4-dihidropiridina*, ugao između 1,4-dihidropiridinskog prstena i karboksilne grupe ( $\theta = \text{C6-C5-C23-O26}$ ) ima vrednost između 30 i 60°. Za ispitivano jedinjenje, za koje je potvrđeno da je nizoldipin, izvršeni su MMX proračuni. Energetski najpovoljnijoj vrednosti konformacije molekula odgovara torzioni ugao  $\theta = \text{C6-C5-C23-O26}$  od -58,6°, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima. Rezultati geometrijske analize rešene kristalne strukture daju vrednost analiziranog torzionog ugla  $\theta = -3,2^\circ$ , koja ukazuje na relativnu planarnost piridinskog prstena i karboksilne grupe vezane u položaju 5, a samim tim i na smanjenu biološku aktivnost jedinjenja u kristalnom stanju. Vrednosti za odgovarajuće torzione uglove dobijene rešavanjem kristalne strukture derivata *1,4-dihidropiridina* metodom rendgenske difrakcije, kao i za ispitivano jedinjenje, date su u Tabeli 3.

**Tabela 3.** Odgovarajući torzioni uglovi molekula u kristalu i u slobodnom molekulu dobijeni molekularno-mehaničkim proračunima

Torzioni ugao	X=H	2-NO <sub>2</sub>	3-NO <sub>2</sub>	3-CN	3-MeO	4-F	2-NO <sub>2</sub> ispitivano	MMX(2- NO <sub>2</sub> )
C3-C4-C7-C12	-72.3	-53.8	-39.1	-38.1	-36.5	-69.8	-53.6(3)	-52.9
C2-C3-C16-O22	-175.0	-177.7	178.2	-2.5	176.9	-176.9	-175.7(3)	-152.4
C6-C5-C23-O26	-4.9	-2.7	7.8	-179.4	-4.0	8.2	-3.2(5)	-58.6

Prethodna istraživanja (1) ukazuju na to da je efekat vrste i položaja supstituenta na fenilnom prstenu nezavisan od prirode C3 i C5 ester supstituenata na piridinskom prstenu. Rezultati bioloških testova pokazali su da su asimetrični estri obično farmakološki aktivniji od odgovarajućih simetričnih estara. Što se tiče položaja supstituenta u fenilnom prstenu u ispitivanim asimetričnim estrima, biološka aktivnost raste u smeru 2 i 3-NO<sub>2</sub> supstituenata. Najveću biološku aktivnost pokazuje ispitivani 2-NO<sub>2</sub> derivat čiji odgovarajući torzioni ugao C3-C4-C7-C12 između piridinskog i fenilnog prstena ima vrednost -53,6(3)° koju potvrđuju i MMX proračuni. Oni ukazuju na minimum energije ispitivanog molekula za vrednost odgovarajućeg torzionog ugla od -52,9° (Tabela 3.)

## ZAKLJUČAK

Kristalna i molekulska struktura jedinjenja, dobijenog kristalizacijom iz rastvora nizoldipina izloženog fotodegradaciji, rešena je metodom difrakcije X-zraka na monokristalu. Analize dužine hemijskih veza u molekulu dovelo je do nesumljive potvrde da se radi o kristalima polaznog jedinjenja. Pretpostavka da se iz rastvora nizoldipina koji je pretrpeo fotodegradaciju iskristalisao jedan od produkata degradacije, pokazala se kao neosnovana. Najverovatnije je da se u procesu kristalizacije iz rastvora u kojem je uočena pojava produkata degradacije, energetski preovladalo udruživanje molekula, koji su u položaje 1 i 4 vezali atome vodonika od prisutnih disociranih H-atoma u rastvoru, što je dovelo do pojave kristala polaznog jedinjenja. Produkti degradacije su pouzdano registrovani u rastvoru, dok u kristalnom stanju još nije potvrđeno njihovo prisustvo, bar ne metodom rendgenostrukturalne analize.

Na osnovu izložene uporedne analize strukture i konformacije molekula i biološke aktivnosti, možemo zaključiti da je aktivnost derivata *1,4-dihidropiridina*, koja se obično ispoljava u rastvoru kada molekul možemo tretirati kao slobodan, u korelaciji sa vrednošću

odgovarajućeg torzionog ugla za konformaciju molekula kojoj odgovara minimalna vrednost energije po molekularno-mehaničkim proračunima. U kristalnom obliku ova konformacija se ne mora održati jer se posmatrani molekul vezuje u kristalnu rešetku i trpi energetske uticaj molekula koji ga okružuju. U slučaju ispitivanog jedinjenja nizoldipina se pokazalo da je ono iskristalisalo u energetski najpovoljnijoj konformaciji za molekul i da torzioni ugao između piridinskog i fenilnog prstena u kristalnom stanju može poslužiti kao pokazatelj potencijalne biološke aktivnosti.

## LITERATURA

1. Fosshem R., A. Joslyn, A. J. Solo, E. Luchowski, A. Rutledge and D. J. Triggle: Crystal Structures and Pharmacologic Activities of 1,4-Dihydropyridine Calcium Channel Antagonists of the Isobutyl Methyl 2,6-Dimethyl-4-(substituted phenyl)-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarboxylate (Nisoldipine) Series, *J. Med. Chem.* **31** (1988), 300-305.
2. Meyer, H., F. Bossert, E. Wehinger, K. Stoepel and W. Vater: Synthesis and comparative pharmacological studies of 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenylpyridine-3,5-dicarboxylates with nonidentical ester functions, *Arzneim. -Forsch/Drug. Res.* **31**, 3 (1981), 407-409.
3. Michelitsch A., J. Reiner, M. Schubert-Zsilavec and W. Likussar: 2,2'-Bis (3-isobutyl oxycaronyl-5-methoxycarbonyl-2,6-dimethyl-4-pyridyl)-azobenzene-N,N'-dioxide: A new degradation product of nisoldipine by UV light, *Pharmazie* **50** (1995), 548-549.
4. Marinković V., B. Gudžić, D. Agbaba, J. Nedeljković, S. Vladimirov: Kinetics of photochemical degradation of solid nisoldipine, Second Pharmaceutical Congress of the Republic of Macedonia, Struga (1999), p. 102.
5. Sheldrick G. M.: SHELXS86 Program for the Solution of Crystal Structures, University of Göttingen, Germany, 1985.
6. Sheldrick G. M.: SHELXL93, Program for the Refinement of Crystal Structures, University of Göttingen, Germany, 1993.
7. Johnson C. K., M. N. Burnett, L. J. Farrugia: Ortep-III Version 1.0.2. University of Glasgow, United Kingdom, 1997.

## CRYSTAL AND MOLECULAR STRUCTURE OF PHOTODEGRADATION PRODUCT OF NISOLDIPINE

*Agneš Kapor, Bela Ribar, Zoran Tomić, Valentina Marinković, Sote Vladimirov*

Potential and generally selective antihypertensive and antianginal activities of nisoldipine have initiated the study of its molecular structure.

The single crystals, which are the potential photodegradation products, were crystallized from methanol solution of nisoldipine, which was exposed to the action of the daylight. They were assumed to be the nitroso derivatives of nisoldipine with the melting point 151-152°C. The crystal and molecular structure was determined by the X-ray diffraction method (MoK $\alpha$ ,  $\lambda=0.71073\text{\AA}$ ). On the basis of 3858 independent reflection intensities, the structure was solved by the direct method using the program SHELXS83 and refined by the least squares method (SHELXL93) up to final R-factor R=0.0578 for 1953 reflection ( $F_o > 4\sigma(F_o)$ ) and 334 parameters. The molecular structure obtained was that of: isobutyl methyl 2,6-dimethyl-4-(2-nitrophenyl)-1,4-dihydro pyridine -3,5 dicarboxylate which confirmed that we are dealing with nisoldipine, so one should not speak about the presence of any assumed photodegradation product.

Prispeo 1. februara 2000.  
Prihvaćen 24. februara 2000.